

【研究報告】

オゾン燻蒸殺菌装置による殺菌消毒

松野一彦,三浦敏明,神力就子

日本医療オゾン研究会会報, Vol.1, No.4, 1-3. (1996)

研究報告

オゾンの血小板凝集におよぼす影響

北海道大学医療技術短期大学部 松野 一彦、三浦 敏明
筑波物質情報研究所 神力 就子

1. はじめに

ドイツを中心としてヨーロッパでは、ウイルス性疾患や血行障害の治療にオゾン療法が取り入れられ、その有効性を認める報告が増えてきているが、効果の機序については未だ不明な点が多い。最近、オゾンの血球におよぼす影響に関して研究が進められ、赤血球でのグルタチオンの減少など解糖系への影響や、好中球でのインターフェロン γ の誘導などが報告されているが、血小板については報告がみられない。今回オゾンの血小板凝集におよぼす影響について検討したので報告する。

2. 方法

健常人より得た血液から作成した多血小板血漿 (PRP) あるいは洗浄血小板浮遊液 (WPS) 1 ml を密閉したシリコン処理試験管に入れ、ここに各種濃度のオゾンガスを注入、1 分間軽く振盪してオゾンと反応させた。オゾンは MEZONE M-10 (日本オゾン、オゾン濃度表示器つき) で発生させ、密閉型マイクロシリンジでオゾンガスを吸引して用いた。血小板凝集は Dual aggregometer (Chrono-Log) を用い透光度法にて測定し、凝集曲線を描かせるとともに 5 分以内の最大凝集率を求めた。細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は CAF-100 (日本分光) を用いて fura-2 法で測定した。

3. 結果

全血にオゾンを添加すると、20~30 μ g/ml 以上で溶血がみられた。しかし PRP あるいは WPS へのオゾンの添加ではオゾン濃度が 75 μ g/ml まで血小板からの乳酸脱水素酵素の遊出は認められなかった。

オゾン処理により PRP での ADP およびコラーゲン凝集は 8.0 μ g/ml から 41.5 μ g/ml までの濃度で濃度依存性に抑制された (図 1、2)。6 回の最大凝集率をまとめると図 3 のようになり、コラーゲン凝集では高濃度のオゾンの添加でほぼ完全に抑制され、ADP 凝集では二次凝集は濃度依存性に抑制されたが、一次凝集は高濃度にも完全に抑制はされなかった。また WPS でもオゾン処理によりトロンビンおよびコラーゲン凝集が濃度依存性に抑制された (図 4~6)。特にトロンビン凝集では凝集開始の抑制が著明であった (図 4)。

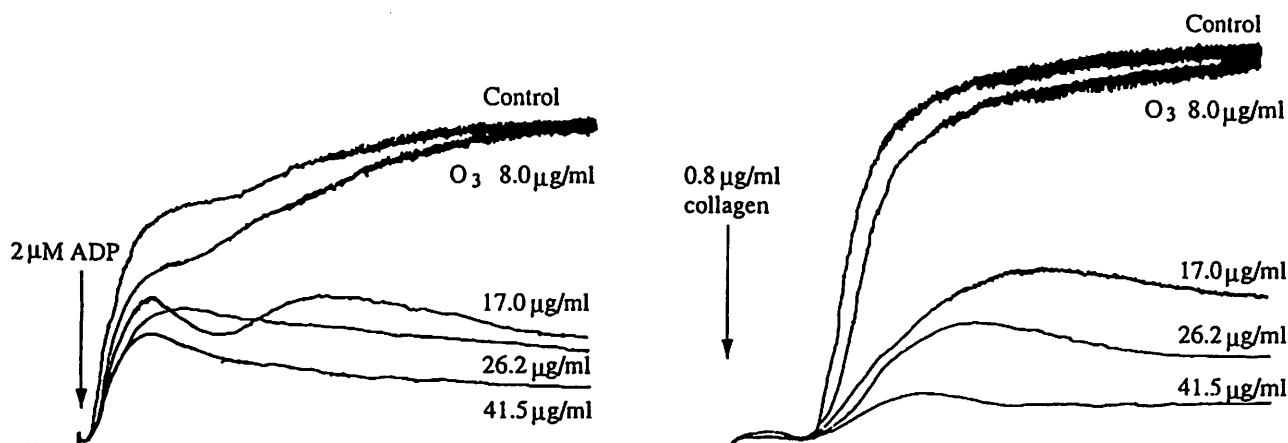


図1 血小板ADP凝集におよぼすオゾンの影響 (PRP)

図2 血小板コラーゲン凝集におよぼすオゾンの影響 (PRP)

オゾンによる血小板凝集抑制の機序を明らかにする目的で、血小板刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ の増加におよぼすオゾンの影響を検討した。オゾンはトロンビンおよびコラーゲン刺激による血小板の $[Ca^{2+}]_i$ の増加を抑制した(図7)。これらのオゾンによる $[Ca^{2+}]_i$ の増加の抑制は、血小板凝集の抑制とほぼ平行した。

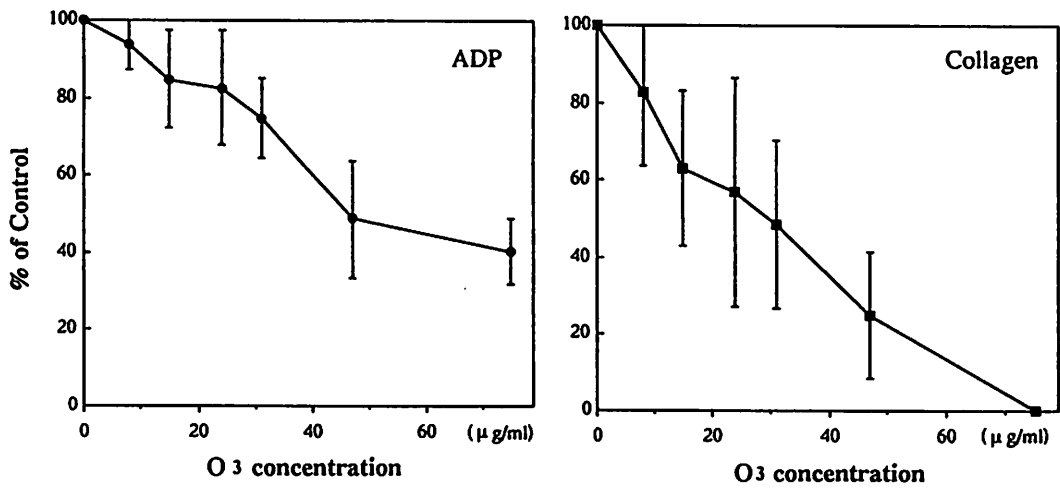


図3 PRPでの最大凝集率におよぼすオゾンの影響

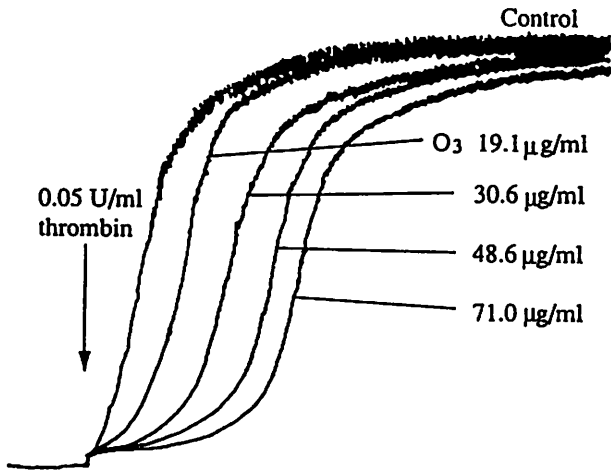


図4 血小板トロンビン凝集におよぼすオゾンの影響 (WPS)

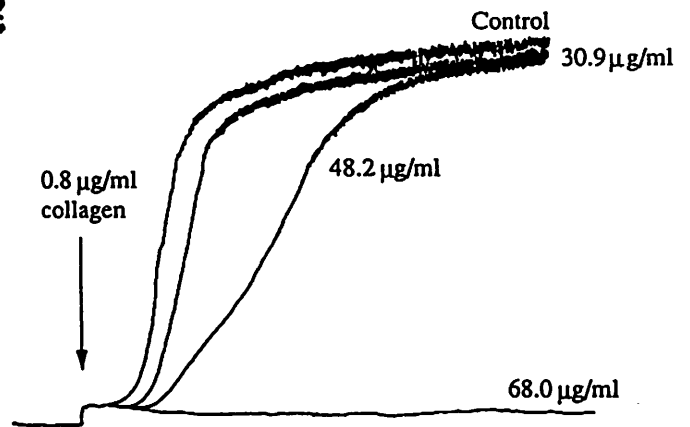


図5 血小板コラーゲン凝集におよぼすオゾンの影響 (WPS)

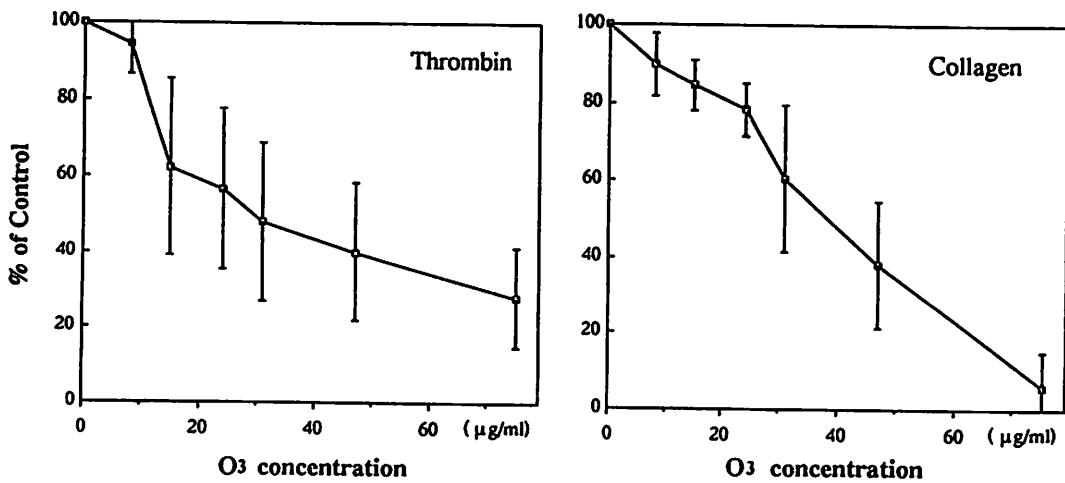


図6 WPSでの最大凝集率におよぼすオゾンの影響

4. 考察

血小板は粘着・凝集・放出などのいわゆる活性化反応を介して一次止血に重要な役割を果たしているのみならず、血栓症の発症や動脈硬化の進展にも関与している。臨床的には血小板機能を阻害する抗血小板薬が脳梗塞や心筋梗塞などの血栓性疾患の予防・治療に広く使われて、その効果が認められている。オゾン療法の有効性は、下肢動脈の循環不全の治療にも認められており、オゾンが血小板の機能に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

今回の実験では、オゾンを全血に一定濃度以上を加えると赤血球の溶血が起こったため、血液から血小板を分離し血漿に浮遊させたPRP、あるいは血小板を電解質溶液に浮遊させたWPSの状態でおゾンを負荷した。この条件では、75 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度のオゾンでは血小板の破壊は認められなかった。

まずPRPではADP凝集、コラーゲン凝集ともオゾンの添加により濃度依存性に抑制された。しかし低濃度ではADP二次凝集とコラーゲン凝集がより強く抑制されたことからcyclooxygenaseの抑制の可能性が推測された。またWPSでの実験でも、トロンビン凝集、コラーゲン凝集はともに濃度依存性に抑制された。特にトロンビン凝集では刺激後の凝集の立ち上がりが遅延する、すなわちラグタイムの延長が特徴的であった。この特徴的なトロンビン刺激でのラグタイムの延長から、トロンビン刺激後の細胞内カルシウム代謝の障害が推測されたので、蛍光 Ca^{2+} インジケータ-fura-2を用いて刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を測定した。オゾンはトロンビンあるいはコラーゲン刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制し、これは濃度的に凝集の抑制と平行していた(図7)。以上からオゾンは何らかの機序を介して刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制し、これによって血小板の凝集を阻害していることが推測された。今後、細胞内カルシウム代謝を抑制する要因についてさらに検討が必要と考えられる。

(解説) 血小板の働き 血小板は直径2 μm の円盤型の非常に小型の細胞であるが、止血に重要な役割を果たしている。血管が破れて出血が起こると、血小板は速やかに血管内皮下の膠原線維に粘着し、血小板内に含有する種々の生理活性物質を放出し、血小板同士が互いに凝集しあって血小板凝集塊を形成して、一時止血を完了させる。その後、凝固系が働いてフィブリン血栓(凝固血栓)が形成されて、より完全な止血が完成する。

血小板凝集のメカニズム 血小板が膠原線維と結合したり、ADPやトロンビンなどの刺激を受けると、その情報が血小板内に入り、ホスホリパーゼCの活性化を介して、1,4,5-イノシトール三リン酸(IP_3)と1,2-ジアシルグリセロール(DG)が産生される。 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} プールである暗調小管系から細胞質へ Ca^{2+} を動員し、細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度を増加させる。増加した Ca^{2+} はカルモジュリンを介してミオシン軽鎖キナーゼを活性化し、ミオシン軽鎖のリン酸化によってアクチンとミオシンの相互反応を促進する。これによって細胞骨格系の変化と連動して、血小板膜上にある糖タンパク(GP)の一つである GPIIb と GPIIIa が複合体を形成し、ここにフィブリンノーゲンが結合することによって、血小板-血小板の凝集が成立する。

血小板活性化の制御 血小板に前述のような刺激が加わり、いわゆる活性化が起こると、凝集とともにADPやセロトニンなどの生理活性物質を放出する。これが必要以上におこると血栓症の発症につながる可能性があるため、いくつかの制御系がある。特に血管内皮細胞が重要な役割を果たしており、一つはプロスタグランジン I_2 (PGI_2)で、これは血小板の PGI_2 レセプターに結合することによって、血小板内のサイクリックAMP(cAMP)を増加させる。さらに内皮細胞由来弛緩因子(EDRF, NO)を産生し、これは血小板内に入ってサイクリックGMP(cGMP)を増加させる。cAMPおよびcGMPはそれぞれ別の経路で血小板内 Ca^{2+} 代謝を阻害して、血小板活性化を抑制すると考えられている。

まつの かずひこ

昭和47年北海道大学医学部卒業。北大第三内科、聖路加国際病院内科、昭和大学藤が丘病院血液内科、北大医学部臨床検査医学講座を経て現職。専門は臨床検査医学、内科学、特に血液学。研究テーマは血小板活性化機構など。

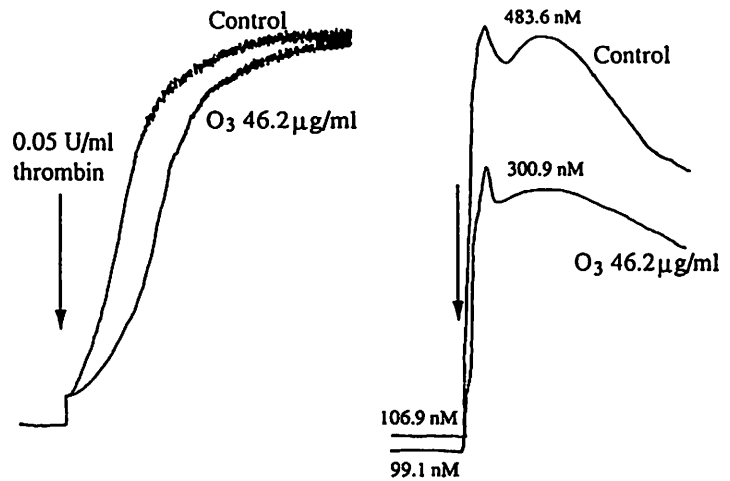


図7 トロンビン凝集(左図)とトロンビン刺激による細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度(右図)におよぼすオゾンの影響